

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-66183

(43)公開日 平成8年(1996)3月12日

(51)IntCl ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/02 5/06		7729-4B		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	E

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平6-205385
(22)出願日 平成6年(1994)8月30日

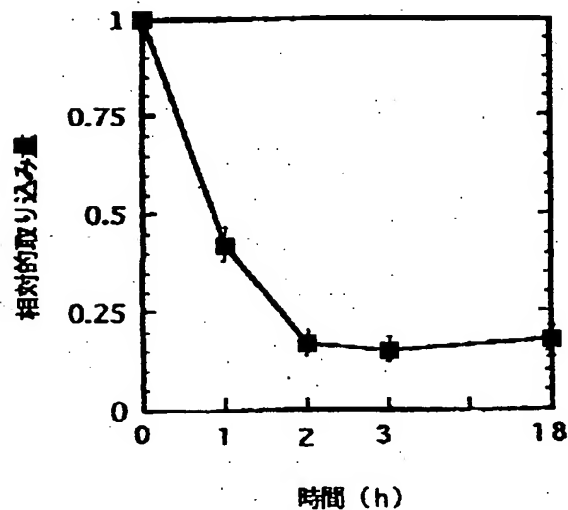
(71)出願人 390014535
新技術事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72)発明者 佐藤 智
京都府京都市中京区御池通堀川東入る鍛冶
町 190番地
(74)代理人 弁理士 西澤 利夫

(54)【発明の名称】 細胞活動の制御方法

(57)【要約】

【構成】 真核細胞の培養培地に塩化リチウムまたはウォートマンニンを添加し、細胞の細胞外物質取り込み活動を低下もしくは停止させることを特徴とする細胞活動の制御方法。

【効果】 細胞の生存および増殖を損なうことなく、エンドサイトーシスを選択的に低下もしくは停止することが容易となり、個体生存のための医療技術や有用物質の生物生産を担う細胞利用に新たな途が拓ける。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 真核細胞の培養培地に塩化リチウムを添加し、細胞の細胞外物質取り込み活動を低下もしくは停止させることを特徴とする細胞活動の制御方法。

【請求項2】 塩化リチウムの添加量が10~100 mMである請求項1の細胞活動の制御方法。

【請求項3】 真核細胞の培養培地にウォートマンニンを添加し、細胞の細胞外物質の取り込み活動を低下もしくは停止させることを特徴とする細胞活動の制御方法。

【請求項4】 ウォートマンニンの添加量が2~200 nMである請求項3の細胞活動の制御方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、細胞活動の制御方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、培養条件下にある真核細胞のエンドサイトーシスを制御するための簡便な方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】ヒトをはじめとする真核生物は、その細胞が分裂増殖を繰り返し、活発な機能発現能を有する細胞を次々に産生することによって個体が維持されている。一つの細胞が分裂し、さらにもう一度分裂するまでの期間を細胞周期と言い、この細胞周期は、染色体の分離および細胞質の分裂が生じる「分裂期」とそれに続く「間期」とに大別される。このうち、間期にある細胞は、細胞に不可欠な蛋白質を産生するためのmRNA合成や、染色体DNAの複製を行うが、また同時に、細胞外の液相にある高分子物質を受容体を介してあるいは液相そのものを小胞体によって細胞内に取り込む活動（エンドサイトーシス）を普遍的に行っている。このエンドサイトーシスは、細胞の代謝や信号物質伝達等と共役し、個体の生存および物質産生を支えている重要な細胞活動であると考えられている。

【0003】従って、このエンドサイトーシスを制御することは、真核細胞による有用物質の産生、あるいは医療技術の開発等に大きく寄与するものと期待されている。培養条件下にある真核細胞のエンドサイトーシスを低下もしくは停止させる方法としては、従来より、ショ糖などの添加による高浸透圧下で細胞を培養する方法、細胞質カリウムイオンを低下させる方法、脂溶性酸やアミン等によって細胞質pHを低下させる方法等が知られている。しかしながら、これらの方法の場合には、それぞれの作用の標的分子が明らかでなく、効果も一過性で毒性がある。しかも特殊な細胞培養液を用いる必要があり、実際上の応用可能性は乏しいと言わざるを得ない。

【0004】この発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、細胞生存を損なうことなく、エンドサイトーシスを選択的に低下もしくは停止することのできる簡便な方法を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、真核細胞の培養培地に塩化リチウムを添加し、細胞の細胞外物質取り込み活動を低下もしくは停止させることを特徴とする細胞活動の制御方法を提供する。またこの発明は、真核細胞の培養培地にウォートマンニンを添加し、細胞の細胞外物質の取り込み活動を低下もしくは停止させることを特徴とする細胞活動の制御方法をも提供する。

【0006】

【作用】この発明の方法においては、分裂能を有する真核細胞の培養液中に塩化リチウムまたはウォートマンニンを添加するだけの簡単な操作によって、その培養細胞のエンドサイトーシスを低下もしくは停止させる。活動低下の程度は、培養液への塩化リチウムまたはウォートマンニンの添加量によって操作することができるが、塩化リチウムは10~100 mMの範囲で、またウォートマンニンは2~200 nMの範囲で添加することにより、細胞の生存を損なうことなく、しかも細胞増殖に影響を及ぼすことなく、エンドサイトーシスを選択的に低下もしくは停止させることができる。

【0007】エンドサイトーシスを回復させる場合には、培養液を交換して塩化リチウムまたはウォートマンニンを洗浄除去すればよい。塩化リチウムまたはウォートマンニンの添加量に応じて数時間から数十時間後にはエンドサイトーシスが回復する。なお、培養液それ自体は特別な組成を必要とせず、公知のイーグルMEM培地やダルベッコ変法MEM培地等を用いればよい。

【0008】以下、実施例を示してこの発明の方法についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0009】

【実施例】

実施例1

ヒト培養細胞株HT1080を直径3 cmのプラスチックディッシュで常法に従って培養し、その培地であるイーグルMEM培養液に1 M塩化リチウムを終濃度50 mMの割合で添加した。塩化リチウムの添加から1、2、3および18時間後、培養液に西洋わさびパーオキシダーゼ（HRP）を1 mg/mlの濃度で添加し、その20分後に新しい培養液で細胞を洗浄し、細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0010】結果は、図1に示した通りである。この図1は、HRP活性の測定値を、細胞数を反映する細胞タンパク質量にて規格化し、それを塩化リチウム無添加（時間0）の活性値と比較した結果を示す。この図1から明らかなように、細胞のHRP取り込み（エンドサイトーシス）は塩化リチウムの添加によって経時的に抑制され、添加後3時間では対照（時間0）の15%まで低下した。

【0011】なお、50 mM塩化リチウムの添加による

3

4

細胞損傷や増殖阻害は観察されなかった。また、他の高分子物質の取り込みにおいてもHRPに対するのと同様の効果が観察された。さらに、蛍光標識化デキストランを予め取り込ませた細胞を塩化リチウムを含む培養液で処理すると、対照（塩化リチウム無添加）の細胞では蛍光が核周辺に密集する膜小胞に認められたのに対し、塩化リチウム処理細胞では膜小胞が細胞全体に分散していた。一方、受容体に特異的に結合して細胞内に取り込まれるトランスフェリンを標識化して取り込ませた細胞の場合、対照細胞では細長い標識膜器官が観察されたのに対し、塩化リチウム処理細胞では膜器官が細断小胞化しているのが認められた。

実施例2

ヒト培養細胞株HT1080を実施例1と同様に培養し、その培養液に1M塩化リチウムを図2に示した各終濃度で添加した。塩化リチウムの添加から1時間後、培養液にHRPを1mg/mlの濃度で添加し、その20分後に新しい培養液で細胞を洗浄し、細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0012】結果は、図2に示した通りである。この図2は、図1と同様にHRP活性の測定値を規格化し、それを塩化リチウム無添加の活性値と比較した結果を示す。この図2から明らかなように、細胞のエンドサイトーシスは塩化リチウムの添加量に依存して低下し、その効果は10mM以上で生じることが確認された。

実施例3

ヒト培養細胞株HT1080を実施例1と同様に培養し、その培養液に1M塩化リチウムを終濃度50mMの割合で添加した。塩化リチウムの添加から3時間後、新鮮な培養液で細胞を3度洗浄し、洗浄から図3に示した時間ののち培養液にHRPを1mg/mlの濃度で添加し、その20分後に細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0013】結果は、図3に示した通りである。この図3は、図1と同様にHRP活性の測定値を規格化し、それを細胞洗浄直後（時間0）の活性値と比較した結果を示す。この図3から明らかなように、塩化リチウムの添加によって低下したエンドサイトーシスは、塩化リチウムの除去から経時的に回復し、4時間以降はほぼもとの水準に達することが確認された。

実施例4

ヒト培養細胞株HT1080を直径3cmのプラスチックディッシュで常法に従って培養し、その培地であるダルベッコ変法MEM培養液にウォートマンニン終濃度50nMの割合で添加した。ウォートマンニンの添加後、図4の横軸上段に示した時間で培養液にHRPを1mg/mlの濃度で添加し、その10分後に新しい培養液で細胞を洗浄し、細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0014】結果は、図4に示した通りである。この図

4は、HRP活性の測定値を、細胞数を反映する細胞タンパク質量にて規格化し、それをウォートマンニン無添加（時間C）の活性値と比較した結果を示す。また、横軸下段は細胞がウォートマンニンと接触した時間を示す。この図4から明らかなように、細胞のHRP取り込み（エンドサイトーシス）はウォートマンニンの添加によって速やかに抑制され、10分間の接触で対照の35%まで低下した。

【0015】なお、50nMウォートマンニンの添加による細胞損傷や増殖阻害は観察されなかった。また、他の高分子物質の取り込みにおいてもHRPに対するのと同様の効果が観察された。さらに、蛍光標識化デキストランを予め取り込ませた細胞を50nMウォートマンニンを含む培養液で処理すると、対照の細胞では蛍光が核周辺に密集する膜小胞に認められたのに対し、ウォートマンニン処理細胞では膜小胞が細胞全体に分散していた。一方、受容体に特異的に結合して細胞内に取り込まれるトランスフェリンを標識化して取り込ませた細胞の場合、対照細胞では細長い標識膜器官が観察されたのに対し、ウォートマンニン処理細胞では膜器官が小胞化しているのが認められた。

実施例5

ヒト培養細胞株HT1080を実施例4と同様に培養し、その培養液にウォートマンニンを図5に示した各終濃度で添加した。ウォートマンニンの添加から1時間後、培養液にHRPを1mg/mlの濃度で添加し、その20分後に新しい培養液で細胞を洗浄し、細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0016】結果は、図5に示した通りである。この図5は、図4と同様にHRP活性の測定値を規格化し、それをウォートマンニン無添加の活性値と比較した結果を示す。この図5から明らかなように、細胞のエンドサイトーシスの低下は、2~3nM以上のウォートマンニン添加で生じることが確認された。

実施例6

ヒト培養細胞株HT1080を実施例4と同様に培養し、その培養液にウォートマンニンを終濃度50nMの割合で添加した。ウォートマンニンの添加から1時間後、新鮮な培養液で細胞を3度洗浄し、洗浄から図6に示した時間ののち培養液にHRPを1mg/mlの濃度で添加し、その20分後に細胞に取り込まれたHRPの酵素活性を測定した。

【0017】結果は、図6に示した通りである。この図6は、図4と同様にHRP活性の測定値を規格化し、それを細胞洗浄直後（時間0）の活性値と比較した結果を示す。この図6から明らかなように、ウォートマンニンの添加によって低下したエンドサイトーシスは、ウォートマンニンの除去によってもゆっくりとしか回復せず、18時間を要しても80%の水準にしか達しないことが確認された。

【0018】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、細胞の生存および増殖を損なうことなく、エンドサイトーシスを選択的に低下もしくは停止することのできる簡便な方法が提供される。これにより、個体生存のための医療技術や有用物質の生物生産を担う細胞利用に新たな途が拓ける。

【図面の簡単な説明】

【図1】塩化リチウム添加後のHRP取り込み量の経時的変化を示す。

【図2】塩化リチウムの添加によるHRP取り込み量の量依存的变化を示す。

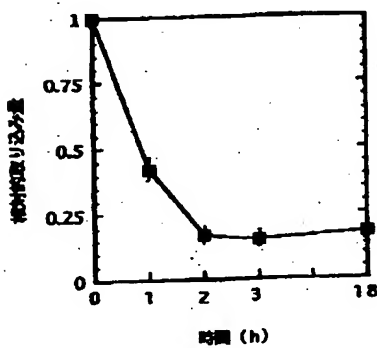
【図3】塩化リチウム添加後のHRP取り込み量回復の経時の変化を示す。

【図4】ウォートマンニン添加後のHRP取り込み量の経時の変化を示す。

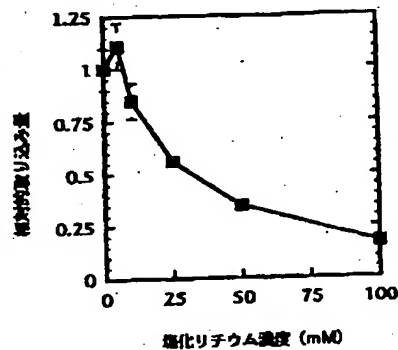
【図5】ウォートマンニンの添加によるHRP取り込み量の量依存的变化を示す。

【図6】ウォートマンニン添加後のHRP取り込み量回復の経時の変化を示す。

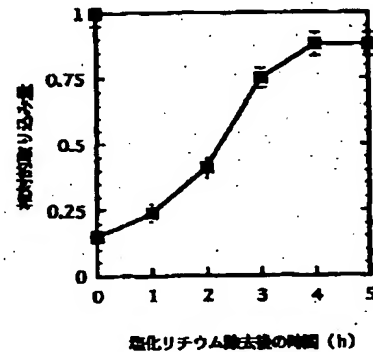
【図1】



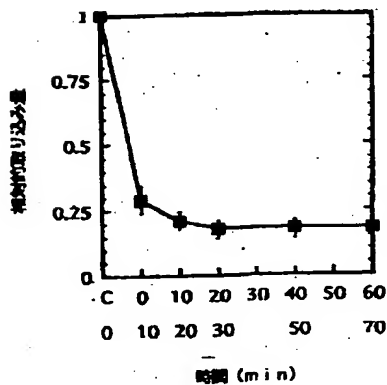
【図2】



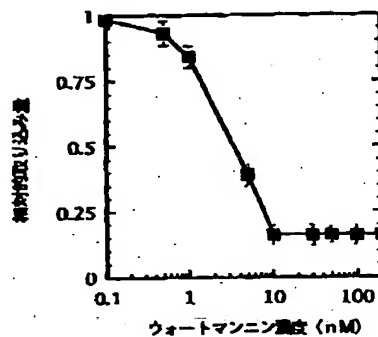
【図3】



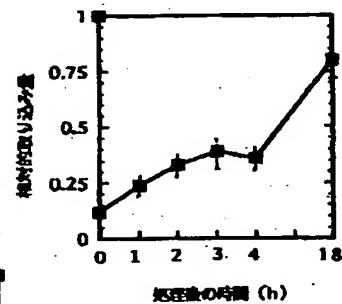
【図4】



【図5】



【図6】



CLIPPEDIMAGE= JP408066183A

PAT-NO: JP408066183A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08066183 A

TITLE: CONTROL OF CELL ACTIVITY

PUBN-DATE: March 12, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

SATO, SATOSHI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

RES DEV CORP OF JAPAN

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP06205385

APPL-DATE: August 30, 1994

INT-CL (IPC): C12N005/02;C12N005/06

ABSTRACT:

PURPOSE: To control cell activity for use in medical techniques and productions of useful materials by adding LiCl to a culture medium for eucaryotic cells, lowering the cell activity for incorporating extracellular materials into the cell and suppressing endocytosis without inhibiting cell proliferation.

CONSTITUTION: This method for controlling cell activity is to cultivate eucaryotic cells such as human culture cells HT1080, etc., in a culture medium for eucaryotic cells mixed with 10-100mM lithium chloride and lower or stop the cell activity for incorporating extracellular materials (endocytosis) without inhibiting cell existence and cell proliferation. The lowering or stopping of the endocytosis is confirmed by adding horseradish.

peroxidase (HRP) into the culture medium after a certain time from the addition of lithium chloride and measuring the enzyme activity of the incorporated HRP into the cells after a certain time after the addition of the HRP. By this method, it is easy to selectively lower or stop the endocytosis. This method controls the cell activity and leads to open new applications in medical techniques for individual existence and the use of cells contributing to productions of useful materials, etc.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO